

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

## REQUEST FOR FILING APPLICATION

Under Rule 53(a), (b) & (f)

(No Filing Fee or Oath/Declaration)  
(Do NOT use for Provisional or PCT Applications)  
Use for Design or Utility Applications

PATENT  
APPLICATION

**RULE 53(f) NO DECLARATION**

Assistant Commissioner of Patents  
and Trademarks  
Washington, DC 20231

Atty. Dkt.

PM 265182

M#

990159BT

Client Ref

Date:

December 8, 1999

Sir:

1. This is a Request for filing a new Patent Application (☐ Design ☒ Utility) entitled:

2. (Complete) Title:

NEUE FÜR DAS POXB-GEN CODIERENDE NUKLEOTIDSEQUENZEN

without a filing fee or Oath/Declaration but for which is enclosed the following:

3. ☒ Abstract 1 page(s).4. 34 Pages of Specification (only spec. and claims); 5. ☒ Specification in non-English language6. 16 Numbered claim(s); and7. ☒ 1 sheet(s) per set; ☐ 1 set informal; 8. ☒ formal of size: ☒ A4 ☐ 11"

Drawings:

9. **DOMESTIC/INTERNATIONAL** priority is claimed under 35 USC 119(e)/120/365(c) based on the following provisional, nonprovisional and/or PCT international application(s):

| Application No. | Filing Date | Application No. | Filing Date |
|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| (1)             |             | (2)             |             |
| (3)             |             | (4)             |             |
| (5)             |             | (6)             |             |

10. **FOREIGN** priority is claimed under 35 USC 119(a)-(d)/365(b) based on filing in GERMANY

| Application No.  | Filing Date      | Application No. | Filing Date |
|------------------|------------------|-----------------|-------------|
| (1) 199 51 975.7 | October 28, 1999 | (2)             |             |
| (3)              |                  | (4)             |             |
| (5)              |                  | (6)             |             |

11.        (No.) Certified copy (copies): ☐ attached; ☐ previously filed (date)         
in U.S. Application No.        /        filed on       12. ☐ This is a reissue of Patent No.       13. ☐ See top first page re prior Provisional, National, International application(s) (X box only if info is there and do not complete corresponding item 14 or 15.)14. ☐ **Amend the specification** by inserting before the first line -- This is a ☐ Continuation-in-Part  
☐ Divisional ☐ Continuation ☐ Substitute Application (MPEP 201.09) of:14(a) ☐ National Appln. No.        /        filed        -- (M#       )14(b) ☐ International Appln. No. PCT/        filed       15. ☐ **Amend the specification** by inserting before the first line: --This application  
claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/       , filed        --16. Extension to date: ☐ concurrently filed ☐ not needed ☐ previously filed

17. ☐ Prior application is assigned to

by Assignment recorded \_\_\_\_\_ Reel \_\_\_\_\_ Frame \_\_\_\_\_

18. ☐ Attached:

19. This application is made by the following named inventor(s)

(Double check instructions for accuracy.):

|                     |                                      |                       |                        |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| (1) Inventor        | Nicole                               |                       | DUSCH                  |
|                     | First                                | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           | Bielefeld                            | GERMANY               | GERMANY                |
|                     | City                                 | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address | Am Poggenpohl 38, Bielefeld, Germany |                       |                        |
| (include Zip Code)  | D-33619                              |                       |                        |

|                     |          |                       |                        |
|---------------------|----------|-----------------------|------------------------|
| (2) Inventor        | Brigitte |                       | BATHE                  |
|                     | First    | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           |          |                       |                        |
|                     | City     | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address |          |                       |                        |
| (include Zip Code)  |          |                       |                        |

|                     |                                       |                       |                        |
|---------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| (3) Inventor        | Jörn                                  |                       | KALINOWSKI             |
|                     | First                                 | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           | Bielefeld                             | GERMANY               | GERMANY                |
|                     | City                                  | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address | Lenbachstrasse 19, Bielefeld, Germany |                       |                        |
| (include Zip Code)  | D-33615                               |                       |                        |

|                     |  |                       |                        |
|---------------------|--|-----------------------|------------------------|
| (4) Inventor        | Alfred                                   |                       | PÜHLER                 |
|                     | First                                    | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           | Bielefeld                                | GERMANY               | GERMANY                |
|                     | City                                     | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address | Am Waldschlösschen 2, Bielefeld, Germany |                       |                        |
| (include Zip Code)  | D-33739                                  |                       |                        |

|                     |                                      |                       |                        |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| (5) Inventor        | Bettina                              |                       | MÖCKEL                 |
|                     | First                                | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           | Bielefeld                            | GERMANY               | GERMANY                |
|                     | City                                 | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address | Mittelstrasse 15, Bielefeld, Germany |                       |                        |
| (include Zip Code)  | D-33602                              |                       |                        |

20. NOTE: FOR ADDITIONAL INVENTORS, check box ☒ and attach sheet with same information regarding additional inventors.

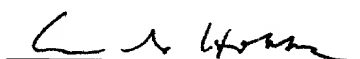
Pillsbury Madison & Sutro LLP  
Intellectual Property Group

1100 New York Avenue, N.W.  
Ninth Floor, East Tower  
Washington, D.C. 20005-3918  
Tel: (202) 861-3000  
Atty/Sec: ASH/mhn

By: Atty: Ann S. Hobbs

Reg. No. 36830

Sig:



Fax: (202) 822-0944  
Tel: (202) 861-3063

NOTE: File in duplicate with 2 post card receipts (PAT-103) & attachments

**REQUEST FOR FILING APPLICATION**  
**Under Rule 53(a), (b)(1) & (d)(1)**  
**(Continued : Additional Inventors)**

|                     |                                 |                       |                        |
|---------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|
| (6) Inventor        | Anke                            |                       | WEISSENBORN            |
|                     | First                           | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           | Tübingen                        | GERMANY               | GERMANY                |
|                     | City                            | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address | Falkenweg 66, Tübingen, Germany |                       |                        |
| (include Zip Code)  | D-72076                         |                       |                        |

|                     |                                |                       |                        |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------------|
| (7) Inventor        | Walter                         |                       | PFEFFERLE              |
|                     | First                          | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           | Halle                          | GERMANY               | GERMANY                |
|                     | City                           | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address | Jahnstrasse 33, Halle, Germany |                       |                        |
| (include Zip Code)  | D-33790                        |                       |                        |

|                     |       |                       |                        |
|---------------------|-------|-----------------------|------------------------|
| (8) Inventor        |       |                       |                        |
|                     | First | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           |       |                       |                        |
|                     | City  | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address |       |                       |                        |
| (include Zip Code)  |       |                       |                        |

|                     |       |                       |                        |
|---------------------|-------|-----------------------|------------------------|
| (9) Inventor        |       |                       |                        |
|                     | First | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           |       |                       |                        |
|                     | City  | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address |       |                       |                        |
| (include Zip Code)  |       |                       |                        |

|                     |       |                       |                        |
|---------------------|-------|-----------------------|------------------------|
| (10) Inventor       |       |                       |                        |
|                     | First | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           |       |                       |                        |
|                     | City  | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address |       |                       |                        |
| (include Zip Code)  |       |                       |                        |

|                     |       |                       |                        |
|---------------------|-------|-----------------------|------------------------|
| (11) Inventor       |       |                       |                        |
|                     | First | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           |       |                       |                        |
|                     | City  | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address |       |                       |                        |
| (include Zip Code)  |       |                       |                        |

|                     |       |                       |                        |
|---------------------|-------|-----------------------|------------------------|
| (12) Inventor       |       |                       |                        |
|                     | First | Middle Initial        | Family Name            |
| Residence           |       |                       |                        |
|                     | City  | State/Foreign Country | Country of Citizenship |
| Post Office Address |       |                       |                        |
| (include Zip Code)  |       |                       |                        |

# APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PM 21123/265182  
(M#)

Invention: NEUE FÜR DAS POXB-GEN CODIERENDE NUKLEOTIDSEQUENZEN

Inventor(s): DUSCH, Nicole  
BATHE, Brigitte  
KALINOWSKI, Jörn  
PÜHLER, Alfred  
MÖCKEL, Bettina  
WEISSENBORN, Anke  
PFEFFERLE, Walter

Pillsbury Madison & Sutro LLP  
Intellectual Property Group  
1100 New York Avenue, N.W.  
Ninth Floor, East Tower  
Washington, D.C. 20005-3918  
Attorneys  
Telephone: (202) 861-3000

This is a:

- ☐ Provisional Application
- ☒ Regular Utility Application
- ☐ Continuing Application
- ☐ PCT National Phase Application
- ☐ Design Application
- ☐ Reissue Application
- ☐ Plant Application
- ☐ Substitute Specification  
Sub. Spec. filed \_\_\_\_\_  
in App. No. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- ☐ Marked Up Specification re  
Sub. Spec. filed \_\_\_\_\_  
in App. No. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

## SPECIFICATION

### Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das poxB-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin durch Abschwächung des poxB-Gens.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere Lysin finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

### Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren insbesondere L-Lysin bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

L-Aminosäuren, insbesondere Lysin finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

5 Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält

ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, Punkt d insbesondere pCR2.1poxBint, hinterlegt in E.coli DSM 13114

und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die in dem pox-Gen eine Insertion oder Delektion enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthalten mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Pyruvat-Oxidase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Pyruvat-Oxidase Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase



Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für Pyruvat-Oxidase codieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Basen.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

- 10 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, 15 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

- Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen das Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Pyruvat-Oxidase und auch solche 20 ein, die zu wenigstens 70% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

- 25 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die Aminosäuren, insbesondere L-Lysin produzieren und in denen die für das poxB-Gen codierenden 30 Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die  
5 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese  
10 Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen.  
15 Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu  
20 produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die bekannten Wildtypstämme

25 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
30 *Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020  
und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende  
Mutanten bzw. Stämme,

wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709

*Brevibacterium flavum* FERM-P 1708

*Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712

5 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463

*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464 und

*Corynebacterium glutamicum* DSM 5714 Den Erfindern

gelang es, das neue, für das Enzym Pyruvat-Oxidase (EC

1.2.2.2) kodierende *poxB*-Gen von *C. glutamicum* zu

10 isolieren.

Zur Isolierung des *poxB*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses

Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von

Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und

15 Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das

Lehrbuch von Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland,

1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: *Molecular*

*Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory

20 Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die

des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (*Cell*

50, 495 - 508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe

et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265, 1996)

25 beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die

mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987,

*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*,

84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,

1988, *Nucleic Acids Research* 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326, 1992)

30 wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum*

ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und

Collins, *Gene* 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (*The Cloning*

*and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid*

*Biosynthetic Genes from Corynebacterium glutamicum*. Ph.D.

35 Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997)

beschreibt die Klonierung von *C. glutamicum* Genen unter

Verwendung des von Short et al. (Nucleic Acids Research, 16: 7583) beschriebenen  $\lambda$  Zap Expressionssystems.

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$  (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85,2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des

National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Auf diese Weise wurde die neue für das poxB-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No.

5 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des poxB-Genproduktes  
10 dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID  
15 No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben.

20 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.  
25 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press,  
30 Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des poxB-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des poxB-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen  
5 kombiniert werden.

Die Erniedrigung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise  
10 Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z. B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und  
15 Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers  
20 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen sind  
25 aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762  
30 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen  
35 können bekannten Lehrbüchern der Genetik und

Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,  
5 Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens  
10 einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations) in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen  
15 Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und  
20 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen eine  
25 Insertionsmutagenese des poxB-Gens durchgeführt werden kann, ist pCR2.1poxBint (Figur 1).

Plasmid pCR2.1poxBint besteht aus dem von Mead et al. (Bio/Technology 9:657-663 (1991)) beschriebenen Plasmid pCR2.1-TOPO, in das ein internes Fragment des poxB-Gens,  
30 dargestellt in SEQ-ID No. 3, eingebaut wurde. Dieses Plasmid führt nach Transformation und homologer Rekombination in das chromosomale poxB-Gen (Insertion) zu einem Totalverlust der Enzymfunktion. Auf diese Weise wurde beispielhaft der Stamm DSM5715::pCR2.1poxBint hergestellt,  
35 dessen Pyruvat-Oxidase ausgeschaltet ist. Weitere

Anleitungen und Erläuterungen zur Insertionsmutagenese findet man beispielsweise bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9,84-87 (1991)) oder Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)).

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des poxB-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin

- gleichzeitig das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335), oder
- 15 • gleichzeitig das für die Tetradihydrodipicolinat Succinylase kodierende dapD Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 180, 3159-3165 (1998)), oder
- gleichzeitig das Gen für die Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen (Wehrmann et al.,  
20 Journal of Bacteriology 177: 5991-5993 (1995)), oder
- gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- 25 • gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen(Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)), oder



- gleichzeitig das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222)

überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren,  
5 insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der  
Abschwächung des poxB-Gens unerwünschte Nebenreaktionen  
auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing  
Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products,  
Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London,  
10 UK, 1982).

Die das Polynukleotid gemäß Anspruch 1 enthaltenden  
Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und  
können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch -  
Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch  
15 (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren  
(repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von  
L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine  
Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im  
Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die  
20 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,  
1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und  
periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag,  
Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den  
25 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen  
von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im  
Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der  
American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,  
1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und  
30 Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose,  
Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und  
Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und  
Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure  
und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und

organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden.

Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt,

- 5 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung
- 10 verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das
- 15 Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines
- 20 einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

- Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure
- 25 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika
- 30 hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die
- 35 Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird

normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei

- 5 Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174)
- 10 beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* Stamm DH5 $\alpha$ /pCR2.1poxBint als DSM 13114.

## Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

## Beispiel 1

- 5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus  
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI  
10 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)  
15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
20 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
25 Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend  
30 mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic

Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory  
5 Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

10

## Beispiel 2

### Isolierung und Sequenzierung des poxB-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,  
15 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular  
20 Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021,  
25 Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
30 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit

T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

- Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1737 Basenpaaren, welches als poxB-Gen bezeichnet wurde. Das poxB-Gen kodiert für ein
- 5 Polypeptid von 579 Aminosäuren.

### Beispiel 3

#### Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des poxB-Gens

- 10 Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für C. glutamicum bekannten Sequenz des poxB-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion
- 15 ausgewählt:

poxBint1:

5` TGC GAG ATG GTG AAT GGT GG 3`

poxBint2:

5` GCA TGA GGC AAC GCA TTA GC 3`

- 20 Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion
- 25 durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein ca. 0,9 kb großen DNA-Fragment isoliert, welches ein internes Fragment des poxB-Gens trägt und in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

- Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA
- 30 Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der E. coli Stamm DH5 $\alpha$  mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1poxBint genannt.

#### Beispiel 4

Integrationsmutagenese des poxB-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715

Der in Beispiel 2 genannte Vektor pCR2.1poxBint wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al.(FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1poxBint kann in DSM5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1poxBint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Für den Nachweis der Integration wurde das poxBint Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter



Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
(Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-  
Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.

Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach  
5 der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 -  
1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den  
Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten. Die  
entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese  
aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma  
10 Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3  
genannte Plasmid pCR2.1poxBint hatte innerhalb des  
chromosomalen poxB-Gens ins Chromosom von DSM5715  
inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCR2.1poxBint  
bezeichnet.

#### 15 Beispiel 5

##### Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 3 erhaltene C. glutamicum Stamm  
DSM5715::pCR2.1poxBint wurde in einem zur Produktion von  
20 Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt  
im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem  
entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin  
(25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von  
25 dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10  
ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die  
Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet. Diesem  
wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 48  
Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert.  
30 Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so  
daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug.  
Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

## Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50g/l

## Salze:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  25 g/l

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,0 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  10 mg/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  10 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,0mg/l

Biotin (sterilfiltriert) 0,3 mg/l

Thiamin \* HCl (sterilfiltriert) 0,2 mg/l

Leucin (sterilfiltriert) 0,1 g/l

$\text{CaCO}_3$  25 g/l

5 CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte  $\text{CaCO}_3$  zugesetzt.

10 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik  
5 (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

| Stamm                  | OD(660) | Lysin-HCl<br>g/l |
|------------------------|---------|------------------|
| DSM5715                | 13,1    | 9,5              |
| DSM5715::pCR2.1poxBint | 12,5    | 12,9             |

Folgende Figuren sind beigefügt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1poxBint.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

5

|            |  |
|------------|--|
| ColE1 ori: | Replikationsursprung des Plasmids ColE1      |
| lacZ:      | 5'Ende des $\beta$ -Galactosidase Gens       |
| f1 ori:    | Replikationsursprung des Phagen f1           |
| KmR:       | Kanamycin Resistenz                          |
| ApR:       | Ampicillin Resistenz                         |
| BamHI:     | Schnittstelle des Restriktionsenzym<br>BamHI |
| EcoRI:     | Schnittstelle des Restriktionsenzym<br>EcoRI |
| poxBint:   | internes Fragment des poxB-Gens              |

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 990159 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2160

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (327)..(2063)

25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; -35\_signal

&lt;222&gt; (227)..(232)

&lt;220&gt;

30

&lt;221&gt; -10\_signal

&lt;222&gt; (256)..(261)

&lt;400&gt; 1

35

ttagaggcga ttctgtgagg tcaactttttg tggggtcggg gtctaaattt ggccagtttt 60

cgaggcgacc agacaggcgt gcccacgatg tttaaataagg cgatcgggtg gcatctgtgt 120

ttggtttcga cgggctgaaa ccaaaccaga ctgccagca acgacggaaa tcccaaaagt 180

40

gggcatccct gtttggtacc gagtaccac cggggcctga aactccctgg caggcgggcg 240

aagcgtggca acaactggaa tttaagagca caattgaagt cgcaccaagt taggcaacac 300

45

aatagccata acgttgagga gttcag atg gca cac agc tac gca gaa caa tta 353

Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu

1

5

50

att gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat ggt ttg gtg 401

Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val

10

15

20

25

ggg gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa tca gat att 449

Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile

30

35

40

55

gag tgg gtg cac gtt cga aat gag gaa gcg gcg gcg ttt gca gcc ggt 497

Glu Trp Val His Val Arg Asn Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly

45

50

55

|    |   |      |
|----|---|------|
|    | gcg gaa tcg ttg atc act ggg gag ctg gca gta tgt gct gct tct tgt | 545  |
|    | Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys |      |
|    | 60 65 70  |      |
| 5  | ggg cct gga aac aca cac ctg att cag ggt ctt tat gat tcg cat cga | 593  |
|    | Gly Pro Gly Asn Thr His Leu Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg |      |
|    | 75 80 85  |      |
| 10 | aat ggt gcg aag gtg ttg gcc atc gct agc cat att ccg agt gcc cag | 641  |
|    | Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln |      |
|    | 90 95 100 105   |      |
| 15 | att ggt tcg acg ttc ttc cag gaa acg cat ccg gag att ttg ttt aag | 689  |
|    | Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys |      |
|    | 110 115 120   |      |
| 20 | gaa tgc tct ggt tac tgc gag atg gtg aat ggt ggt gag cag ggt gaa | 737  |
|    | Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu |      |
|    | 125 130 135   |      |
| 25 | cgc att ttg cat cac gcg att cag tcc acc atg gcg ggt aaa ggt gtg | 785  |
|    | Arg Ile Leu His His Ala Ile Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val |      |
|    | 140 145 150   |      |
| 30 | tcg gtg gta gtg att cct ggt gat atc gct aag gaa gac gca ggt gac | 833  |
|    | Ser Val Val Val Ile Pro Gly Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp |      |
|    | 155 160 165   |      |
| 35 | ggg act tat tcc aat tcc act att tct tct ggc act cct gtg gtg ttc | 881  |
|    | Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe |      |
|    | 170 175 180 185   |      |
| 40 | ccg gat cct act gag gct gca gcg ctg gtg gag gcg att aac aac gct | 929  |
|    | Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala |      |
|    | 190 195 200   |      |
| 45 | aag tct gtc act ttg ttc tgc ggt gcg ggc gtg aag aat gct cgc gcg | 977  |
|    | Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala |      |
|    | 205 210 215   |      |
| 50 | cag gtg ttg gag ttg gcg gag aag att aaa tca ccg atc ggg cat gcg | 1025 |
|    | Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala |      |
|    | 220 225 230   |      |
| 55 | ctg ggt ggt aag cag tac atc cag cat gag aat ccg ttt gag gtc ggc | 1073 |
|    | Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly |      |
|    | 235 240 245   |      |
| 60 | atg tct ggc ctg ctt ggt tac ggc gcc tgc gtg gat gcg tcc aat gag | 1121 |
|    | Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu |      |
|    | 250 255 260 265   |      |
| 65 | gcg gat ctg ctg att cta ttg ggt acg gat ttc cct tat tct gat ttc | 1169 |
|    | Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe |      |
|    | 270 275 280   |      |
| 70 | ctt cct aaa gac aac gtt gcc cag gtg gat atc aac ggt gcg cac att | 1217 |
|    | Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile |      |
|    | 285 290 295   |      |

|    |   |      |
|----|---|------|
|    | ggt cga cgt acc acg gtg aag tat ccg gtg acc ggt gat gtt gct gca | 1265 |
|    | Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala |      |
|    | 300 305 310   |      |
| 5  | aca atc gaa aat att ttg cct cat gtg aag gaa aaa aca gat cgt tcc | 1313 |
|    | Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser |      |
|    | 315 320 325   |      |
| 10 | ttc ctt gat cgg atg ctc aag gca cac gag cgt aag ttg agc tcg gtg | 1361 |
|    | Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val |      |
|    | 330 335 340 345   |      |
| 15 | gta gag acg tac aca cat aac gtc gag aag cat gtg cct att cac cct | 1409 |
|    | Val Glu Thr Tyr Thr His Asn Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro |      |
|    | 350 355 360   |      |
| 20 | gaa tac gtt gcc tct att ttg aac gag ctg gcg gat aag gat gcg gtg | 1457 |
|    | Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val |      |
|    | 365 370 375   |      |
| 25 | ttt act gtg gat acc ggc atg tgc aat gtg tgg cat gcg agg tac atc | 1505 |
|    | Phe Thr Val Asp Thr Gly Met Cys Asn Val Trp His Ala Arg Tyr Ile |      |
|    | 380 385 390   |      |
| 30 | gag aat ccg gag gga acg cgc gac ttt gtg ggt tca ttc cgc cac ggc | 1553 |
|    | Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg Asp Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gly |      |
|    | 395 400 405   |      |
| 35 | acg atg gct aat gcg ttg cct cat gcg att ggt gcg caa agt gtt gat | 1601 |
|    | Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro His Ala Ile Gly Ala Gln Ser Val Asp |      |
|    | 410 415 420 425   |      |
| 40 | cga aac cgc cag gtg atc gcg atg tgt ggc gat ggt ggt ttg ggc atg | 1649 |
|    | Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala Met Cys Gly Asp Gly Gly Leu Gly Met |      |
|    | 430 435 440   |      |
| 45 | ctg ctg ggt gag ctt ctg acc gtt aag ctg cac caa ctt ccg ctg aag | 1697 |
|    | Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr Val Lys Leu His Gln Leu Pro Leu Lys |      |
|    | 445 450 455   |      |
| 50 | gct gtg gtg ttt aac aac agt tct ttg ggc atg gtg aag ttg gag atg | 1745 |
|    | Ala Val Val Phe Asn Asn Ser Ser Leu Gly Met Val Lys Leu Glu Met |      |
|    | 460 465 470   |      |
| 55 | ctc gtg gag gga cag cca gaa ttt ggt act gac cat gag gaa gtg aat | 1793 |
|    | Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn |      |
|    | 475 480 485   |      |
| 60 | ttc gca gag att gcg gcg gct gcg ggt atc aaa tcg gta cgc atc acc | 1841 |
|    | Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr     |      |
|    | 490 495 500 505   |      |
| 65 | gat ccg aag aaa gtt cgc gag cag cta gct gag gca ttg gca tat cct | 1889 |
|    | Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro |      |
|    | 510 515 520   |      |

gga cct gta ctg atc gat atc gtc acg gat cct aat gcg ctg tcg atc 1937  
 Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile  
 525 530 535  
 5 cca cca acc atc acg tgg gaa cag gtc atg gga ttc agc aag gcg gcc 1985  
 Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala  
 540 545 550  
 10 acc cga acc gtc ttt ggt gga gga gta gga gcg atg atc gat ctg gcc 2033  
 Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala  
 555 560 565  
 15 cgt tcg aac ata agg aat att cct act cca tgatgattga tacacctgct 2083  
 Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile Pro Thr Pro  
 570 575  
 gttctcattg accgcgagcg cttaactgcc aacatttcca ggatggcagc tcacgccggt 2143  
 20 gcccatgaga ttgccct 2160  
 <210> 2  
 <211> 579  
 25 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <400> 2  
 30 Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile  
 20 25 30  
 35 Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn  
 35 40 45  
 Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly  
 50 55 60  
 40 Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu  
 65 70 75 80  
 45 Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala  
 85 90 95  
 Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln  
 100 105 110  
 50 Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu  
 115 120 125  
 Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile  
 130 135 140  
 55 Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser Val Val Val Ile Pro Gly  
 145 150 155 160



Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr  
 165 170 175  
 5 Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala  
 180 185 190  
 Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys  
 195 200 205  
 10 Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile  
 225 230 235 240  
 15 Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr  
 245 250 255  
 20 Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu  
 260 265 270  
 Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala  
 275 280 285  
 25 Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys  
 290 295 300  
 Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro  
 305 310 315 320  
 30 His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys  
 325 330 335  
 35 Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val Val Glu Thr Tyr Thr His Asn  
 340 345 350  
 Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu  
 355 360 365  
 40 Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val Phe Thr Val Asp Thr Gly Met  
 370 375 380  
 Cys Asn Val Trp His Ala Arg Tyr Ile Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg  
 385 390 395 400  
 45 Asp Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gly Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro  
 405 410 415  
 50 His Ala Ile Gly Ala Gln Ser Val Asp Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala  
 420 425 430  
 Met Cys Gly Asp Gly Gly Leu Gly Met Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr  
 435 440 445  
 55 Val Lys Leu His Gln Leu Pro Leu Lys Ala Val Val Phe Asn Asn Ser  
 450 455 460  
 Ser Leu Gly Met Val Lys Leu Glu Met Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu  
 465 470 475 480

Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala  
 485 490 495

5 Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu  
 500 505 510

10 Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile  
 515 520 525

Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu  
 530 535 540

15 Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly  
 545 550 555 560

Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile  
 565 570 575

20 Pro Thr Pro

25 <210> 3  
 <211> 875  
 <212> DNA  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

30 <400> 3  
 tgcgagatgg tgaatggtgg tgagcagggt gaacgcattt tgcattcacgc gattcagtcc 60  
 accatggcgg gtaaagggtg gtcggtggta gtgattcctg gtgatatcgc taaggaagac 120  
 gcagggtgac gtacttattc caattccact atttcttctg gcaactcctg ggtgttcccg 180  
 35 gatcctactg aggctgcagc gctggtggag gcgattaaca acgctaagtc tgtcactttg 240  
 ttctgcggtg cgggcgtgaa gaatgctcgc gcgcagggtg tggagttggc ggagaagatt 300  
 aaatcaccga tcgggcatgc gctgggtggt aagcagtaca tccagcatga gaatccgttt 360  
 gaggtcggca tgtctggcct gcttggttac ggcgctgcg tggatgcgtc caatgaggcg 420  
 gatctgctga ttctattggg tacggatttc ccttattctg atttccttcc taaagacaac 480  
 gttgccaggg tggatatcaa cggtgccgac attggtcgac gtaccacggg gaagtatccg 540  
 40 gtgaccggtg atgttgctgc aacaatcgaa aatattttgc ctcatgtgaa ggaaaaaaca 600  
 gatcgttcct tccttgatcg gatgctcaag gcacacgagc gtaagttgag ctcggtggta 660  
 gagacgtaca cacataacgt cgagaagcat gtgcctattc accctgaata cgttgccctc 720  
 attttgaacg agctggcgga taaggatgcg gtgtttactg tggataccgg catgtgcaat 780  
 gtgtggcatg cgaggtacat cgagaatccg gagggaacgc gcgactttgt gggttcattc 840  
 45 cgccacggca cgatggctaa tgcgttgcct catgc 875

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2,  
enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ-ID-No. 1,  
oder
  - 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)  
innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Codes einspricht, oder
  - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur  
Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz  
10 hybridisiert, und gegebenenfalls
  - (iv) funktionsneutrale Sinnmutanten in (i)
7. Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
insbesondere Punkt d, hinterlegt in E.coli, DSM 13114.
8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die  
15 eine Deletion oder eine Insertion in dem poxB-Gen  
enthalten.
9. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,  
insbesondere L-Lysin,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
20 daß man folgende Schritte durchführt,
  - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden Bakterien, in denen man zumindest  
das poxB-Gen abschwächt,
  - b) Anreicherung des gewünschten L-Aminosäure im  
25 Medium  
oder in den Zellen der Bakterien, und
  - c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
30 daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich

weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
5 daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die Expression des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, insbesondere 1 a bis 1 c verringert.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymproteins) herabsetzt, für das das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, insbesondere 1 a bis 1 c codiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zur Abschwächung die Integrationsmutagenese mittels des Plasmids pCR2.1poxBint, dargestellt in Figur 1 und hinterlegt als DSM 13114, oder eines seiner  
25 Bestandteile verwendet.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man für die Herstellung von L-Lysin Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder  
30 mehrere Gene überexprimiert, ausgewählt aus der Gruppe
  - das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen,

- das die S-(2-Aminoethyl)-Cystein-Resistenz vermittelnde DNA-Fragment,
  - das die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
  - das Gen für die Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen
  - das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende dap-Gen
  - das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen
  - das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen.
16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium glutamicum einsetzt.

**Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen**

## Zusammenfassung

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine  
Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens  
70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von  
SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von  
a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren durch Abschwächung des poxB-Gens.

Figur 1: Plasmidkarte pCR2.1poxBint

